

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

007790597

WPI Acc No: 1989-055709/198908

XRAM Acc No: C89-024606

**Co-polyester contg. 3hydroxy-butyrate units and its prepn. - by  
profitable and easy method giving co-polyester of good strength**

Patent Assignee: MITSUBISHI KASEI CORP (MITU ); MITSUBISHI KASEI CO (MITU )

Inventor: DOI Y

Number of Countries: 005 Number of Patents: 014

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
EP 304293	A	19890222	EP 88307635	A	19880817	198908	B
JP 1048820	A	19890223	JP 87204537	A	19870818	198914	
JP 1048821	A	19890223	JP 87204538	A	19870818	198914	
JP 1156320	A	19890619	JP 87316446	A	19871215	198930	
JP 1222788	A	19890906	JP 8849015	A	19880302	198942	
US 4876331	A	19891024	US 88230461	A	19880810	199001	
JP 2027992	A	19900130	JP 88178448	A	19880718	199010	
EP 304293	B1	19930317	EP 88307635	A	19880817	199311	
DE 3879320	G	19930422	DE 3879320	A	19880817	199317	
			EP 88307635	A	19880817		
JP 95014352	B2	19950222	JP 8849015	A	19880302	199512	
JP 95014354	B2	19950222	JP 88178448	A	19880718	199512	
JP 95103230	B2	19951108	JP 87316446	A	19871215	199549	
JP 95113055	B2	19951206	JP 87204537	A	19870818	199602	
JP 96019227	B2	19960228	JP 87204538	A	19870818	199613	

Priority Applications (No Type Date): JP 88178448 A 19880718; JP 87204537 A 19870818; JP 87204538 A 19870818; JP 87316446 A 19871215; JP 8849015 A 19880302

Cited Patents: 2.Jnl.Ref; A3...9006; EP 204442; EP 69497; No-SR.Pub

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

EP 304293 A E 29

Designated States (Regional): DE GB IT

US 4876331 A 17

EP 304293 B1 E 29 C12P-007/62

Designated States (Regional): DE GB IT

DE 3879320 G C12P-007/62 Based on patent EP 304293

JP 95014352 B2 5 C12P-007/62 Based on patent JP 1222788

JP 95014354 B2 4 C12P-007/62 Based on patent JP 2027992

JP 95103230 B2 7 C08G-063/06 Based on patent JP 1156320

JP 95113055 B2 7 C08G-063/06 Based on patent JP 1048820

JP 96019227 B2 7 C08G-063/06 Based on patent JP 1048821

Abstract (Basic): EP 304293 A

Copolyester comprises 3-hydroxybutyrate units (3HB) and units selected from (1) 3- and 5-hydroxyvalerate units (3HV, 5HV); (2) 4-hydroxybutyrate units (4HB); and (3) 4HB and 3HV; the intrinsic viscosity of the copolyester (in chloroform at 30 deg.C) is 0.4-10.0 dl/g. Prodn. of a copolyester as above comprises propagating a microorganism capable of producing poly-3-hydroxybutyrate, and culturing the microorganism in a limited source of nitrogen and/or phosphorus and in the presence of a carbon source to form and accumulate the copolyester in the microorganism, the carbon source being selected from (i) a cpd. of formula:  $(CH_2X_1CH_2CH_2COO)_nY_1$ , X<sub>1</sub> = hydroxyl, halogen, n<sub>1</sub> = 1-4; Y<sub>1</sub> = hydrogen, or unit- to tetravalent metal atom; (ii) a cpd. of formula  $(CH_2X_1CH_2CH_2COO)_nY_1$ ; (iii)

$(CH_2X_3CHX_4CH_2CH_2COO)n_1Y_1$ , X<sub>3</sub> = hydrogen halogen or hydroxyl; (iv) 1,4-butanediol; (v) gamma-butyrolactone.

ADVANTAGE - Industrially profitable and easy method for producing a copolyester in which the molar content of other units is relatively large when compared with that of the 3-hydroxybutyrate units. Where the ratio of 3-hydroxybutyrate is less than 50 mol.%, the copolyester has good strength, and the spinning and rolling thereof becomes easier and stabilised. The thus obtd. prods. e.g. fibres and films are flexible and tough.

0/9

Abstract (Equivalent): EP 304293 B

A copolyester comprising 3-hydroxybutyrate units and units selected from: (1) 3-hydroxyvalerate units and 5-hydroxyvalerate units; (2) 4-hydroxybutyrate units; and (3) 4-hydroxybutyrate units and 3-hydroxyvalerate units; the intrinsic viscosity of the copolyester when measured in chloroform at 30degC being from 0.4 to 10.0 dl/g.

(Dwg. 0/9)

Abstract (Equivalent): US 4876331 A

The copolyester comprising a 3-hydroxybutyrate unit and one unit from (1) 3-hydroxyvalerate and a 5-hydroxyvalerate, (2) 4-hydroxybutyrate and (3) 4-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate, having an intrinsic viscosity of 0.4-10.0 dl/g (CHCl<sub>3</sub>, at 30 deg.C), is prep'd. by propagating a microorganism having an ability of producing poly-3-hydroxybutyrate, and culturing the microorganism under a limitation of N and/or P and in the presence of a carbon source and accumulating the copolyester in the microorganism.

USE - Biomedical materials are mfd. using the copolyester.

(17pp)a

Title Terms: CO; POLYESTER; CONTAIN; HYDROXY; BUTYRATE; UNIT; PREPARATION; EASY; METHOD; CO; POLYESTER; STRENGTH

Derwent Class: A23; D16

International Patent Class (Main): C08G-063/06; C12P-007/62

International Patent Class (Additional): A61L-017/00; C08G-063/40; C08G-063/78; C08H-005/00; C12N-001/20; C12R-001/05; D01F-006/84; C12P-007/62; C12R-001-05

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): A03-C02; A05-E02; A12-W11L; D05-C; D05-H08

Plasdoc Codes (KS): 0004 0226 0230 1291 1840 1985 2095 2148 2150 2174 2382  
2386 2396 2416 2471 2524 2559 2617 2628 2629 2663 2667 2513

Polymer Fragment Codes (PF):

\*001\* 014 02& 038 04& 143 144 157 195 239 255 30& 344 347 358 398 402 405  
408 409 419 430 435 481 512 551 556 560 566 567 604 608

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許出願公告番号

特公平7-14352

(24) (44)公告日 平成7年(1995)2月22日

(51) Int.Cl. C 12 P 7/62 // (C 12 P 7/62 C 12 R 1:05)	識別記号 7432-4B	序内整理番号 F I	技術表示箇所
----------------------------------------------------------------	-----------------	---------------	--------

請求項の数1(全5頁)

(21)出願番号 特願昭63-49015	(71)出願人 99999999 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号
(22)出願日 昭和63年(1988)3月2日	(72)発明者 土肥 義治 神奈川県横浜市旭区今宿町2817-39
(65)公開番号 特開平1-222788	(74)代理人 弁理士 長谷川 晴司
(43)公開日 平成1年(1989)9月6日	審査官 谷口 博

(54)【発明の名称】 ポリエステル共重合体の製造方法

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するアルカリゲネス属菌を前段で菌体を増殖させ、後段で該菌体を窒素あるいはリンの制限下で培養して該菌体内にポリ-3-ヒドロキシブチレートを生成・蓄積させるに際して後段の培養を1,4-ブタンジオールの存在下で行なうことを特徴とする3-ヒドロキシブチレート単位および4-ヒドロキシブチレート単位からなるポリエステル共重合体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は、3-ヒドロキシブチレート単位(以下3HB成分と記す)と4-ヒドロキシブチレート単位(以下4HB成分と記す)を含有する共重合体の製造法に関する、更に詳しくは、ポリエステルを蓄積できる微生物を用いて製

2

造される3HB成分、4HB成分からなる新規の共重合ポリエステルの製造法に関する。

【従来の技術】

ポリ-3-ヒドロキシブチレート(PHB)は、エネルギー貯蔵物質として数多くの微生物の菌体内に蓄積され、優れた生物分解性と生体適合性を示す熱可塑性高分子であることから、環境を保全する“クリーン”プラスチックとして注目され、手術糸や骨折固定用材などの医用材料および医薬や農薬を徐々に放出する徐放性システムなど多方面への応用が長年にわたり期待されてきた。特に近年、合成プラスチックが環境汚染や資源循環の観点から深刻な社会問題となるに至り、PHBは石油に依存しないバイオポリマーとして注目されている。

【発明が解決しようとする問題点】

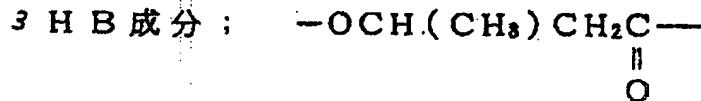
しかしながら、PHBは耐衝撃性に劣るとゆう物性上の問

題とともに、生産コストが高いことから工業的生産が見送られてきた。

近時、3HB成分および3-ヒドロキシパリレート単位（以下3HM成分と記す）を含有する共重合体およびその製造法について、研究、開発がなされ、たとえば、特開昭57-150393号公報および特開昭59-220192号公報にそれぞれ記載されている。

しかしながら、共重合体の3HM成分が0から33モル%まで増大するとこの増大に伴って融解温度( $T_m$ )が180°Cから85°Cまで急激に低下することが知られており[T.L.Bjuhm et al, *Macromolecules*, **19**, 2871 (1986)]そのため、3HM成分含有率の高い共重合体は耐熱性に劣っている。

一方、本発明者は、3HB成分および4HB成分を含有する共重合体およびその製造法について研究、開発を行ない、先に出願した（特願昭62-204538）。かかる共重合体は4HB成分の共重合成分含有率が高い場合でも、高い融点を有することから工業的な価値は高い。しかしながら、この方法では炭素源として高価な試薬を使う必要があったため、工業的に容易に入手できる汎用の炭素源を見い



\* H B 成分 ; -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C=O-

本発明で使用される微生物は、PHI生産能を有する微生物であれば特に制限はないが、実用上は、たとえば、アルカリゲネス フェカリス (*Alcaligenes faecalis*)、アルカリゲネス ルーランディイ (*Alcaligenes rühlandii*)、アルカリゲネス ラタス (*Alcaligenes latus*)、アルカリゲネス アクアマリヌス (*Alcaligenes aquamarinus*) およびアルカリゲネス エウトロフス (*Alcaligenes eutrophus*) 等のアルカリゲネス属などがある。

これらの菌種に属する菌株の代表例として、アルカリゲネス フェカリスATCC8750,アルカリゲネス ルーランディイATCC15749,アルカリゲネス ラタスATCC29712,アルカリゲネス アクアマリヌスATCC14400ならびにアルカリゲネス ユウトロフスH-16ATCC17699およびこのH-16株の突然変異株であるアルカリゲネス ユウトロフスNCIB11597,同NCIB11598,同NCIB11599,同NCIB11600などを挙げることができる。これらのうち、実用上、アルカリゲネス ユウトロフスH-16ATCC17699およびアルカリゲネス ユウトロフスNCIB11599が特に好ましい。

アルカリゲネス属に属するこれらの微生物の菌学的性質は、たとえば、"BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE

\*出すことに対する極めて高い要請があった。

## 〔問題点を解決するための手段〕

本発明者は、以上の点を鑑み、3HB成分および4HB成分からなる共重合体を工業的に有利にかつ容易に製造すべく銳意検討した結果、後段の窒素もしくはリンを制限する培養において1,4-ブタンジオールの存在下でPHB生産能を有する微生物を培養するとこの菌体中に所望の共重合体が生成・蓄積されるとの新知見を得て、本発明に到達した。

10 すなわち本発明は、ポリ-3-ヒドロキシブチレート生産能を有するアルカリゲネス属菌を前段で菌体を増殖させ、後段で該菌体を窒素あるいはリンの制限下で培養して該菌体内にポリ-3-ヒドロキシブチレートを生成・蓄積させるに際して、後段の培養を1,4-ブタンジオールの存在下で行なうことを特徴とする3-ヒドロキシブチレート単位および4-ヒドロキシブチレート単位からなるポリエステル共重合体の製造方法に存する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において、共重合体に含有される3HB成分および4



BACTERIOLOGY: Eighth Edition, The Williams & Wilkins Company/Baltimore"に、また、アルカリゲネス ユウトロフス H-16の菌学的性質は、たとえば、"J. Gen. Microbiol., 115, 185~192 (1979)"にそれぞれ記載されている。

これらの微生物は、従来の方法と同様に、主として菌体を増殖させる前段の培養と、窒素もしくはりんを制限して菌体内に共重合体を生成、蓄積させる後段の培養との2段で培養される。

前段の培養は、微生物を増殖させる為の通常の培養法を適用することができる。すなわち、使用する微生物が増殖し得る培地および培養条件を採用すればよい。

培地成分は、使用する微生物が資化し得る物質であれば特に制限はないが、実用上は、炭素源としては、たとえば、メタノール、エタノールおよび酢酸などの合成炭素源、二酸化炭素などの無機炭素源、酵母エキス、糖蜜、ペプトンおよび肉エキスなどの天然物、アラビノース、グルコース、マンノース、フラクトースおよびガラクトースなどの糖類ならびにソルビトール、マンニトールおよびイノシトールなど、窒素源としては、たとえば、アンモニア、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物および/または、たとえば、尿素、コーン・スティア

ブ・リカ、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物ならびに無機成分としては、たとえば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、りん酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩、ニッケル塩、クロム塩、ほう素化合物およびよう素化合物などからそれぞれ選択される。

また、必要に応じて、ビタミン類なども使用することができる。

培養条件としては、温度は、たとえば、20~40°C程度、好ましくは25~35°C程度とされ、また、pHは、たとえば、6~10程度、好ましくは6.5~9.5程度とされる。このような条件で好気的に培養する。

これらの条件をはずして培養した場合には、微生物の増殖は比較的悪くなるが、これらの条件をはずして培養することを妨げない。

培養方式は、回分培養または連続培養のいずれでもよい。

前段の培養によって得られた菌体を、さらに窒素および／またはりん制限条件下で培養する。

すなわち、前段の培養で得られた培養液から微生物の菌体を、沪過および遠心分離のような通常の固液分離手段により分離回収し、この菌体を後段の培養に付するか、または、前段の培養において、窒素および／またはりんを実質的に枯渋させて、菌体を分離回収することなく、この培養液を後段の培養に移行させることによってもできる。

この後段の培養においては、培地または培養液に窒素および／またはりんを実質的に含有させず、1,4-ブタンジオールを炭素源として含有させること以外は前段の培養と異なるところはない。

尚、培養液に1,4-ブタンジオールを含有させる場合は、培養の初期ないし後期のどの時点でもよいが、培養の初期が好ましい。

本発明に用いられる1,4-ブタンジオールは、共重合体を生成させることができ、かつ微生物の生育を阻害しないような量であればよく使用した微生物の菌株および所望の共重合割合（モル比）などによって異なるが、一般的には培地もしくは培養液1lに3~40g程度が適当である。

この後段の培養においては1,4-ブタンジオールを唯一の炭素源としてもよいが、使用した微生物が資化し得る他の炭素源、たとえば、グルコース、フラクトース、メタノール、エタノール、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸、乳酸および吉草酸などを共存させることもできる。たとえば、グルコースを使用する場合には、多くても1.5g/l程度とされる。

このように培養して得られた培養液から、沪過および遠心分離などの通常の固液分離手段によって菌体を分離回収し、この菌体を洗净、乾燥して乾燥菌体を得、この乾

燥菌体から、常法により、たとえば、クロロホルムのような有機溶剤で生成された共重合体を抽出し、この抽出液に、たとえば、ヘキサンのような貧溶媒を加えて、共重合体を沈殿させる。

本発明の製造法によれば、共重合体中の3HB成分、4HB成分の割合は任意に調節することができる。

#### 〔実施例〕

本発明を、実施例によりさらに具体的に説明する。なお、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1~5及び比較例1~3

アルカリゲネス ユウトロフスH16 (ATCC17699) を使用して共重合体を製造した。すなわち、

#### 前段培養：

つぎの組成を有する培地で前記の微生物を30°Cで24時間培養し、対数増殖期終期の培養液から遠心分離により菌体を分離した。

#### 前段培養用培地の組成

酵母エキス 10g ポリペプトン 10g

20 肉エキス 5g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5g

これらを脱イオン水1lに溶解し、pH7.0に調整した。

#### 後段培養：

前段培養で得られた菌体を、つぎの組成を有する培地に、1lあたり5gの割合で懸濁させ30°Cで48時間培養し、得られた培養液から遠心分離により菌体を分離して、菌体を得た。

#### 後段培養用培地の組成

0.5M りん酸水素カリウム水溶液 39.0ml

0.5M りん酸水素二カリウム水溶液 53.6ml

30 20wt% 硫酸マグネシウム水溶液 1.0ml

炭素源\*

ミネラル溶液\*\* 1.0ml

\* 炭素源として後記表1に記した様な種々の化合物を用いた。（単位g/2培地）

\*\* ミネラル溶液

$\text{CoCl}_2$  119.0mg

$\text{FeCl}_3$  9.7g

$\text{CaCl}_2$  7.8g

$\text{NiCl}_2$  118.0mg

40  $\text{CrCl}_3$  62.2mg

$\text{CaSO}_4$  156.4mg

を0.1N-HCl 1lに溶解

これらを脱イオン水1lに溶解し、pH7.0に調整した。

#### 菌体の処理：

後段培養で得られた菌体を蒸溜水で洗净し、引続きアセトンで洗净し、これを減圧乾燥（20°C、0.1mmHg）して乾燥菌体を得た。

#### 共重合体の分離回収：

このようにして得られた乾燥菌体から熱クロロホルムで50 共重合体を抽出し、この抽出液にヘキサンを加えて共重

合体を沈澱させ、この沈澱を沪取、乾燥して共重合体を得た。

共重合体の特性：

このようにして得られた共重合体の組成、固有粘度、融解温度および融解熱を、つきのようにして測定した。すなわち、

\* 組成： $^1\text{H}$ -NMRスペクトルによる。

固有粘度〔 $\eta$ 〕：30°C、クロロホルム中。

測定結果などを第1表に示す。

尚、実施例2で得られた共重合体の500MHz

$^1\text{H}$ -NMRスペクトルを図1に、125MHz

$^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを図2に各々示した。

表

1

	炭素源 (g)	乾燥菌体重量 (g)	ポリエス テル含量 (wt%)	組成(モル%)			〔 $\eta$ 〕 (d/g)
				3HB	4HB	3HV	
実施例1	1,4-ブタンジオール	20	2.88	8	75	25	0
比較例1	1,3-プロパンジオール	20	3.70	3	94	0	6
比較例2	1,5-ヘンタンジオール	20	3.52	4	95	0	5
実施例2	1,4-ブタンジオール 酪酸	17 3	3.91	34	83	17	0 2.9
実施例3	1,4-ブタンジオール 酪酸	13 7	5.05	52	93	7	0 2.8
実施例4	1,4-ブタンジオール 酪酸	10 10	6.20	63	97	3	0 3.6
実施例5	1,4-ブタンジオール 酪酸	5 15	4.60	47	99	1	0 2.9
比較例3	酪酸	20	4.80	51	100	0	0 3.3

【発明の効果】

本発明によれば、3HB成分、4HB成分を含有する新規のポリエステル共重合体を容易に得ることができる。

さらに本発明で得られた共重合体は、優れた種々の特性を有しているので、手術糸および骨折固定用材などの医用材料の原料として極めて好適であり、また徐放性シス

テムへの利用などの多方面への応用が期待される。

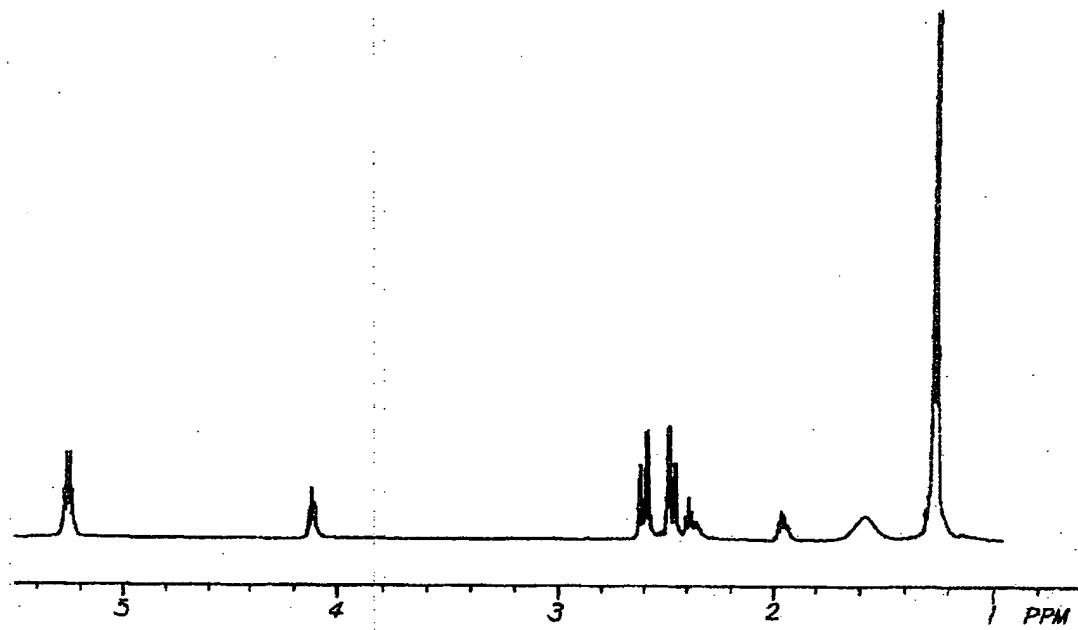
【図面の簡単な説明】

図1は実施例2で得られた共重合体の500MHz、 $^1\text{H}$ -NMRスペクトルであり、図2は同じく実施例2で得られた共重合体の125MHz、 $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルである。

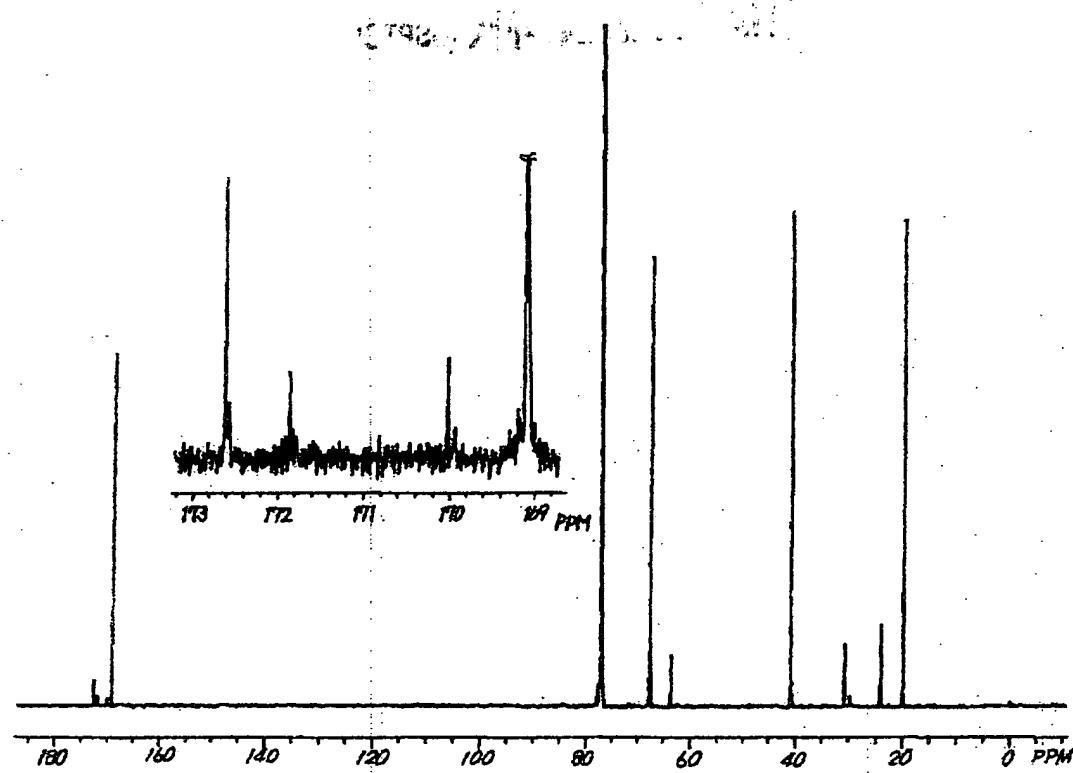
(5)

特公平7-14352

【第1図】



【第2図】



BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**